

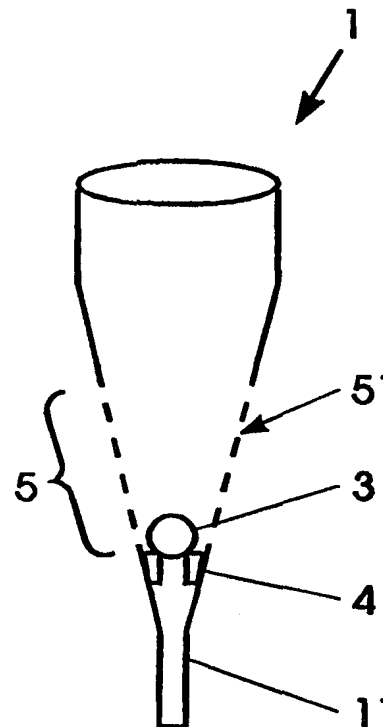
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B01L 3/02	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/16312 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. April 1998 (23.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05696 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Oktober 1997 (15.10.97) (30) Prioritätsdaten: 196 42 777.0 16. Oktober 1996 (16.10.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VETTER, Dirk [DE/DE]; Katharinenstrasse 11, D-07743 Jena (DE). (74) Anwalt: PFEIFFER, Rolf-Gerd; Pfeiffer & Partner, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: PIPETTE**(54) Bezeichnung:** PIPETTE**(57) Abstract**

The invention relates to a pipette which can be used in laboratory automation for a large number of processes for the miniaturization, parallelization and simplification of filtering processes. The aim of the invention is to create a pipette which filters absorbed liquid, which acts as a reactor for microchemical, microbiological or physicochemical reactions and which is particularly suitable for laboratory automation and the processing of large numbers of samples in the ml – sub ml range. Said aim is achieved by providing the pipette (1) in the area of its tip with an integrated means of obturation (3,4) and a filtering element (5).

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Pipette, die im Rahmen der Laborautomatisierung bei zahlreichen Verfahren zur Miniaturisierung, Parallelisierung und Vereinfachung von Filtrationsverfahren Verwendung findet. Die Aufgabe der Erfindung, eine Pipette zu schaffen, die zugleich eine Filtration der aufgenommenen Flüssigkeit bewirkt, welche als Reaktor für mikrochemische bzw. mikrobiologische oder physikochemische Umsetzungen Verwendung finden kann und die für die Laborautomatisierung und die Prozessierung großer Probenzahlen im ml- bis sub-ml-Bereich besonders geeignet ist, wird dadurch gelöst, daß die Pipette (1) im Pipettenspitzenbereich mit einem integrierten Verschlußmittel (3, 4) und mit wenigstens einem Filterelement (5) versehen ist.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Pipette

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft eine Pipette, die im Rahmen der Laborautomatisierung bei zahlreichen Verfahren zur Miniaturisierung, Parallelisierung und Vereinfachung von Filtrationsverfahren Verwendung findet. Sie ist auch zur Anwendung auf dem Gebiet der hochparallelen chemischen Synthese bestimmt.

10

Eine Pipette ist üblicherweise ein längliches, unten offenes Gefäß mit einem oben befindlichen Ansatz zur Befestigung eines dosierfähigen Volumenverdrängungsmechanismus (Peläusball, Kolbenhub etc.). Die Pipette ist meistens nicht fest mit der Dosierhilfe verbunden, sondern
15 zeichnet sich durch die Möglichkeit zum einfachen Wechsel aus. Sie dient dem Transferieren und Aliquotieren von Flüssigkeiten. Charakteristisch für die Arbeitsweise einer Pipette ist, daß die Flüssigkeitsbewegung in der Pipette einen Richtungswechsel erfährt. Ein Pipettievorgang läßt sich somit in drei Schritte zerlegen: bei der
20 Aufnahme steigt die Flüssigkeit von unten nach oben in die Pipette, es erfolgt der Strömungsrichtungswechsel und beim Ausstoßen wandert die Flüssigkeit wieder abwärts und verläßt die Pipette. Diese Arbeitsweise unterscheidet die Pipette von Behältern für bewegliche Flüssigkeiten, wie Schläuchen und Säulen, welche von Flüssigkeiten üblicherweise nur in
25 einer Richtung durchströmt werden.

Ein Flüssigkeitsfilter hingegen dient der Trennung des Lösungsmittels von in ihm suspendierten oder gelösten Bestandteilen. Zu praktischen Zwecken ist er oft mit einem Behälter mit mindestens einer Öffnung zum
30 Eintrag der Lösung und mindestens einer Öffnung zum Ablauf des Lösungsmittels fest verbunden. Üblicherweise befindet sich der Filter zwischen beiden Öffnungen und die Flüssigkeit durchströmt den Behälter ohne Richtungswechsel.

35 In den letzten Jahren haben sich die Einsatzgebiete der Flüssigkeitsfiltration im Laborbetriebs stark ausgeweitet. Die Filtration

dient längst nicht mehr nur der Abtrennung von Partikeln sondern im zunehmenden Maße auch der Abtrennung gelöster Bestandteile. Im Zuge der Laborautomatisierung sind außerdem zahlreiche Verfahren zur Miniaturisierung, Parallelisierung und Vereinfachung der Filtrationsverfahren entwickelt worden.

Üblicherweise befindet sich dabei die zu filtrierende Flüssigkeit in einem Gefäß mit Filterboden, dann werden Zentrifugalkräfte, Vakuum oder Druck angelegt, um die Flüssigkeit in einer vorgegebenen Richtung an der Filterfestphase vorbeizuleiten. Hierbei werden neben den Filtern auch Vorrichtungen zum Auffangen der Flüssigkeiten benötigt. Bei parallelen Anordnungen, wie z.B. im gebräuchlichen 96-Kammer Mikrotiterplattenformat, ist außerdem durch entsprechende Auslaßkonstruktion Sorge zu tragen, daß beim Absaugen keine Vermischung unterschiedlicher Proben auftritt.

Zur Durchführung mikrochemischer Reaktionen sind weiterhin relativ großlumige Reaktionsgefäße bekannt, die aus einem Behälter mit mindestens einer Öffnung bestehen, wobei für Festphasenreaktionen die Öffnungen mit Filtern oder Fritten abgedeckt sein können. Diese dienen der Vereinigung mehrerer Stoffe in fester, gelöster oder flüssiger Form. Zum Durchführen von Reaktionen mit liquiden Komponenten werden die flüssigen Substanzen mit Hilfe einer Pipette in das Reaktionsgefäß gefüllt.

In den letzten Jahren hat sich eine Entwicklung zur Vereinfachung des Laborbetriebs durchgesetzt; sie besteht in der Immobilisierung eines Reaktionspartners. Aufwendige Präzipitations- oder Extraktionsarbeiten sind damit überflüssig. Das Durchführen der Festphasenreaktionen erfordert nur noch die Zufuhr von Lösungen und anschließende Filtrations- oder Absaugschritte, um die in Lösung verbliebenen Reaktionspartner wieder zu entfernen. Das Verfahren ist relativ leicht zu automatisieren und eignet sich zur Bewältigung großer Probenzahlen im ml-Volumenbereich. Es wird heutzutage regelmäßig eingesetzt bei biochemischen oder chemischen Umsetzungen wie der Peptidsynthese, der Oligonukleotidsynthese, der kombinatorischen Chemie, Bioassays wie ELISA oder RIA oder physikochemischen Umsetzungen, wie der

Chromatographie im "batch"-Verfahren bei dem Ionenaustausch bei der DNA-Aufreinigung oder der Festphasenextraktion.

Dabei werden üblicherweise die Flüssigkeiten mittels Pipetten dosiert. Die Festphasen befinden sich in einem Gefäß mit oder ohne Filterboden.

5 Aus der Produkt-Information AMS 422 der Firma Abimed (Postfach 11 11, 40736 Langenfeld) ist ein Einweg-Durchflußreaktor mit eingelegter Fritte bekannt. Dieses System ist aber relativ großvolumig und nicht für eine Parallelisierung und Automatisierung geeignet. Befindet sich die Festphase im Gefäß mit Filterboden, werden Zentrifugalkräfte oder ein
10 Vakuum angelegt, um die Lösungen von der Festphase zu trennen. Hierbei werden neben den Filtern auch Vorrichtungen zum Auffangen der Flüssigkeiten benötigt. Befindet sich die Festphase im Gefäß ohne Filterboden, werden die Lösungen durch Pipettierschritte entfernt, wobei dafür Sorge zu tragen ist, daß die Festphasen nicht in die Pipetten
15 gelangen. Diese Problematik führte beispielsweise zu der Entwicklung von Perlen mit magnetisierbarem Kern, welche sich durch das Anlegen eines Magnetfeldes zur Gefäßwandung ziehen lassen und somit weniger gefährdet sind, durch den Pipettierschritt erfaßt zu werden.

20 Bekanntlich erlauben hochparallele chemische Synthesen die Darstellung von Substanzbibliotheken in vergleichsweise sehr kurzer Zeit. Solche Synthesen werden üblicherweise an einem festen Trägermaterial durchgeführt. Dies erleichtert die Aufarbeitung der Proben und das Verschieben des Reaktionsgleichgewichtes. Das Trägermaterial für die
25 Synthese besteht gemeinhin aus chemisch modifizierten Polymerharzkugeln, Polymerharzblöcken oder -schichten, oder Glasperlen bzw. -platten.

Zwei Typen von hochparallelen Syntheseverfahren sind zu unterscheiden: die Synthese in der Mischung und die Synthese von vereinzelter Proben.
30 Mischungsverfahren haben den Nachteil, daß die Information über die Identität der Substanzen bzw. deren Syntheseprotokolle verloren geht und durch Resynthese und/oder aufwendige biologische Testverfahren wieder beschafft werden muß (Dekonvolutionsverfahren).

Einen Ausweg bietet die "mix-and-split" Synthese an. Hierbei werden
35 Substanzbibliotheken mit dem Ziel erzeugt, pro Polymerharzkugel nur eine Substanz darzustellen. Die Identität der Substanz kann abgeleitet

werden, wenn genügend Material für eine Analyse erhalten wird. Da die aus einer Perle zu gewinnenden Substanzmengen aber oft sehr gering sind, bzw. für den Bioassay benötigt werden, wurden Kodierungsverfahren entwickelt; in einer Parallelsynthese wird dabei die
5 Reaktionsgeschichte der Perle chemisch auf dem Polymerharz festgehalten.

Demgegenüber stehen Methoden, bei welchen alle Bestandteile des Substanzpools in von vornherein räumlich getrennten Bereichen synthetisiert werden. Das Festphasenträgermaterial wird in einer
10 vorgegebenen zweidimensionalen Anordnung ("array") vorgelegt; das jeweilige Reaktionsprotokoll bzw. die entsprechende Zielstruktur ist üblicherweise durch eine xy-Koordinate definiert. Ein sehr illustratives Beispiel wurde von Fodor et al durch den Aufsatz "Light-Directed, Spatially Adressable Parallel Chemical Synthesis" *Science* 251 (1991) pp.
15 767-773 veröffentlicht. Darin werden mit lichtempfindlichen Schutzgruppen beschichtete Glasträger durch photolithographische Prozesse in tausend mikroskopisch kleine Substanzfelder aufgegliedert.

Andere Verfahren benutzen ebenfalls Glasplatten, oder mit Perlen gefüllte mikrokompartimentierte Siliziumscheiben, "Chips".

20 Die Synthese auf mit Polymerharz beschichteten Stäben (Pin-Technologie, siehe "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid" H. M. Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) pp. 3998-4002) hat den Vorteil, mit dem weit verbreiteten 96-Kammern-Mikrotiterplattenformat kompatibel zu
25 sein. Die in der Festphasensynthese bereits erprobten und bekannten Trägermaterialien können mit der kommerziellen Variante der Pin-Technik nicht prozessiert werden. Jedoch sind auch schon Pins beschrieben worden, welche mit Glas- oder Polymerperlen gefüllt werden können ("Diversomers: An approach to nonpeptide, nonoligomeric
30 chemical diversity" S. Hobbs De Witt et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) pp. 6909-6913). In all diesen Fällen wirkt sich für die angestrebte Parallelisierung und Automatisierung der Arbeitsschritte ungünstig aus, daß die Pins, Chips oder Röhrchen nur Träger für die feste Phase darstellen; die Flüssigkeitszufuhr ist nicht im System integriert und
35 muß separat durch Eintauchen oder Spülen erfolgen, siehe den Übersichtsartikel "Multiple Peptide Synthesis Methods and Their

Applications" G. Jung et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (1992) pp 367-383, auch in *Angew. Chem.* 104 (1992) S. 375 ff.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Pipette zu schaffen, die
5 zugleich eine Filtration der aufgenommenen Flüssigkeit bewirkt, welche
als Reaktor für mikrochemische bzw. mikrobiologische oder
physikochemische Umsetzungen Verwendung finden kann und die für
die Laborautomatisierung und die Prozessierung großer Probenzahlen im
ml- bis sub-ml-Bereich besonders geeignet ist.

10 Gemäß der Erfindung wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden
Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Die erfindungsgemäße
Pipette ist im Aufnahme- und Auslaßbereich mit einem Verschlußmittel
und mit wenigstens einem Filterelement versehen. Die vorgeschlagene
15 Pipette trägt wesentlich zur Vereinfachung und Beschleunigung oben
beschriebener Arbeitsabläufe bei. Zentrifugen, Auffanggefäße, separate
Filter und gesonderte Pipetten sowie Absaug- oder
Niederschlagsvorrichtungen und deren Bedienung werden entbehrlich.
Zudem zeigte sich, daß die zur Verbesserung der Effizienz der Filtration
20 führende mehrfache Durchführung derselben an einer entsprechend
modifizierten Pipette sehr viel einfacher durchzuführen ist. Die Pipette ist
besonders geeignet für die Laborautomatisierung und die Prozessierung
großer Probenzahlen im sub-Mililiter-Volumenbereich.
Außerdem kann die vorgeschlagene Pipette als Reaktionsgefäß eingesetzt
25 werden.

Die Pipette besitzt im unteren Bereich, in der Nähe der Pipettenspitze,
einen oder mehrere Auslässe, denen eine filternde Funktion zugeordnet
ist. Insbesondere ist innerhalb der Pipette ein in einer Richtung
öffenbares Verschlußmittel vorgesehen, das mit der
30 Umfangsinnenwandung der Pipette ein Ventil bildet.

Es wurde weiterhin gefunden, daß die Vereinigung von Pipette und
Reaktionsgefäß in einem Element überraschenderweise wesentlich zur
Vereinfachung und Beschleunigung von Syntheseprozessschritten
35 beiträgt. Zentrifugen, Auffanggefäße, Filter und Absaug- oder
Niederschlagsvorrichtungen und deren Bedienung werden durch die

Erfindung entbehrlich. Ein weiterer unerwarteter Vorteil besteht in der verkürzten Reaktionszeit durch die bessere Durchmischung der Reaktanden. Bei Einheit von Pipette und Reaktionsgefäß kann die flüssige Phase beliebig oft aufgenommen und wieder abgegeben werden, die gelösten Reagenzien werden dabei auf besonders effiziente Weise an der Festphase vorbeigeführt. Die Reaktionen sind dadurch wesentlich schneller zum Reaktionsgleichgewicht zu bringen.

Herkömmliche Filtrations- oder Absaugverfahren lassen dies nicht zu und müssen entweder wesentlich längere Inkubationszeiten in Kauf nehmen oder Maßnahmen ergreifen, um die Festphase im Reaktionsgefäß durch Gasströme, mechanisches Schütteln oder Ultraschall zu bewegen, bzw. in einem Ofen oder Temperierbad oder -block zu erwärmen.

Die Erfindung umfaßt jede Kombination aus einem Verschlußmittel, insbesondere Ventil, und einem Filter in Verbindung mit einer ansonsten üblichen Pipette. Zusätzlich kann diese Baugruppe lösliche oder suspendierbare Bestandteile enthalten oder der Filter kann mit bio- oder chemoreaktiven Oberflächen versehen sein. Die modifizierte Oberfläche kann Bestandteil der Pipettenspitzeninnenoberfläche sein, oder die Pipettenspitze kann als Behältnis für Polymerharzperlen oder Glaspartikel dienen. Weiterhin kann die Pipettenspitze als Halterung für Glaskapillaren oder Glasgefäße fungieren, wobei die Reaktion auf Festphasenoberflächen in den Glasbehältnissen stattfindet. Die Erfindung umfaßt auch Pipettenspitzen für die homogene chemische und enzymatische Synthese, sowie für Immunoassays. Hierbei befinden sich vorgelegte Reagenzien in kovalent gebundener, adsorbierter oder adhärierter Form in oder auf der Pipettenspitze.

Bevorzugt sind handelsübliche Einwegpipettenspitzen für Volumina von 0.01 bis 5 ml, welche mit reaktiven Festphasen in loser oder strukturierter Form oder als Block befüllt sind und einen Filter besitzen, um den Austausch von Flüssigkeiten zu gewähren und dabei die Festphasen zurückzuhalten.

Besonders bevorzugt ist eine Pipettenspitze aus Polypropylen mit einem Volumen von 0.001 bis 10 ml, welche im Falle des Einsatzes als Reaktor mit Synthescharz gefüllt ist, und deren untere Öffnung mit einer Kugel verschließbar ist. Bevorzugt ist die Pipettenseitenwand oberhalb des

Verschlußmittels mit Perforationsbohrungen von 0.1 mm Durchmesser versehen. Die Perforationen erlauben den filternden Austritt der Flüssigkeit. Auch kann die Kugel magnetisierbar ausgebildet sein, um sie bei Bedarf von außen magnetisch anzuheben, um im Falle des Einsatzes als Reaktor das Entfernen des Synthescharzes aus der Spitze oder den
5 Eintrag von Syntheseperlen in die Spitze zu ermöglichen.

Die erfindungsgemäße Pipette kann beispielsweise so verwendet werden, daß die Pipettenspitze mit auf einem suspendierbaren Träger immobilisierten, chemisch oder biologisch aktiven Molekülen oder
10 Gruppen beladen wird. Diese modifizierte Pipettenspitze wird anschließend - durch bevorzugt automatische Manipulation - mit Lösungsmitteln oder Waschreagenzien gefüllt. Dabei finden in den Pipettenspitzen chemische Synthesen oder biologische Wechselwirkungen statt.

15 Eine manuelle Synthese eines Dipeptids wird beispielhaft durchgeführt. Hierzu wird eine Kapillare (2 ml Volumen, EM) mit 80 Perlen eines mit einer Aminosäure und einem säurelabilen Linker beladenen Polystyrolharzes (Fmoc-Ala-HMPB, Novabiochem) befüllt und in eine Pipettenspitze eingesteckt. Die Kapillare wird mit Hilfe einer
20 automatischen Pipette fünfmal mit 20% Piperidin/DMF und fünfmal mit einer Lösung von Fmoc-Phe-OH (0.25 M), HBTU (0.25 M), HOBt (0.25 M), DIEA (0.5 M) in DMF und dreimal mit DMF gespült. Die Perlen werden in 0.25 ml 5% TFA/DCM überführt und nach 15 min abfiltriert. Das Filtrat wird eingedampft und in 0.1 ml Acetonitril/0.1% TFA
25 aufgenommen. 20 ml werden mittels HPLC (RP 18 Säule, linearer Gradient von 5 auf 95% Acetonitril/Wasser in 35 min, UV-Detektion bei 220 nm) analysiert. Eine Peakidentifikation geschieht durch Vergleich mit Referenzsubstanzen. Das HPL-Chromatogramm zeigt das Produkt Fmoc-Phe-Ala-OH (Retentionszeit t_R 23.088 min) in hoher Reinheit und guter
30 Ausbeute.

Eine automatisierte Synthese wird beispielsweise an Hand des Dodecapeptids H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr- Leu-Gln-OH durchgeführt. Zehn perforierte und mit Kugelventilen versehene
Pipettenspitzen wurden mit je 2 mg Synthescharz Fmoc-Gln(Trt)-
35 SASRIN (Bachem, Heidelberg) befüllt. Die Spitzen werden auf einen Pipettierroboter (Tomtec Quadra, Zinsser Analytic, Frankfurt) gesteckt

und durch Aufsaugen, Inkubieren und Abgeben von in Mikrotiterplattengefäße vorgelegten Reagenzien elf Syntheszyklen unterzogen. Dabei besteht ein Syntheszyklus aus folgenden Schritten:

- 1 x je 2.3 min Inkubation mit 0.05 ml Dichlormethan,
- 5 2 x je 2.3 min Inkubation mit 0.05 ml Dimethylformamid (DMF) ,
- 4 x je 2 min Inkubation mit 0.05 ml 20%igem Piperidin/(DMF) aus einem Gefäß mit insgesamt 0.15 ml Reagenzlösung,
- 1 x je 2 min Inkubation mit 0.05 ml Dichlormethan,
- 3 x je 2 min Inkubation mit 0.05 ml DMF,
- 10 6 x je 2.25 min Inkubation mit 0.05 ml 0.5 M Fmoc-Aminosäure-OPfp Ester, 1 M Hydroxybenzotriazol (HOBt), 1M Diisopropylethylamin (DIEA) aus einem Gefäß mit insgesamt 0.17 ml Reagenzlösung,
- 1 x je 2.3 min Inkubation mit 0.05 ml DMF,
- 2 x je 2.3 min Inkubation mit 0.05 ml Acetanhydrid/DIEA/HOBt,
- 15 1 x je 2.3 min Inkubation mit 0.05 ml Dichlormethan.

Die aus den Pipettenspitzen erhaltenen Produkte werden mit Trifluoressigsäure/Wasser vom Synthescharz abgespalten, entschützt und durch Etherpräzipitation isoliert. Die Analytik dieser Produkte mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) zeigt Reinheiten von
20 über 95%; ihre Analytik mittels Massenspektrometrie bestätigt die Richtigkeit der Strukturen. Unterschiede zwischen den Produkten aus den verschiedenen Pipettenspitzen wurden nicht festgestellt. Die Qualität der Substanzen ist von gleicher Güte wie die einer kommerziell erhältlichen, HPLC-gereinigten Referenzsubstanz (Hirudin 54-65 desulfated, Bachem,
25 Heidelberg).

Die Verwendung der vorgeschlagenen Pipette als Synthesereaktor wurde vorstehend besonders ausführlich beschrieben, beschränkt die Erfindung jedoch nicht darauf. Wesentlich für alle Einsatzfälle ist, daß die Pipette im Aufnahme- und Auslaßbereich mit einem Verschlußmittel und mit
30 wenigstens einem Filterelement versehen ist.

Die Erfindung wird nachstehend an Hand der schematischen Zeichnungen von zwölf Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 bis 8 acht unterschiedliche Ausführungsformen der vorgeschlagenen Pipette und die
Fig. 9 bis 12 vier verschiedene Ausführungen der Pipette im Falle der Verwendung als Synthesereaktor.

5

In Figur 1 ist eine Pipette 1 dargestellt, die einen Ansatz 2 für eine nicht dargestellte Dosierhilfe aufweist. Zur Flüssigkeitsaufnahme wird die Pipettenspitze 11 in ein entsprechendes Behältnis getaucht und durch Betätigung der Dosierhilfe wird die Flüssigkeit in die Pipette gesaugt. In
10 Figur 1 ist die Pipette 1 mit einer Kugel 3, die mit einem ringförmigen Sitz 4 ein Kugelventil bildet, versehen. Beim Ansaugen der Flüssigkeit öffnet sich das Kugelventil, wohingegen bei Druckbeaufschlagung der Dosierhilfe sich das Ventil schließt. Im Fall von Figur 1 ist die Kugel 3 porös ausgebildet, so daß sie beim Auspressen der in der Pipette 1
15 befindlichen Flüssigkeit gleichzeitig als Filter wirkt.

Die Ausführung nach Figur 2 entspricht im wesentlichen der nach Fig. 1, wobei hier die Kugel 3 nicht porös ausgebildet ist und z.B. auf Glas oder Metall ausgeführt sein kann, wohingegen jedoch der Sitz 4 porös
20 ausgebildet ist und somit die Filterfunktion beim Auspressen der Flüssigkeit übernimmt.

Figur 3 entspricht einer Kombination der Ausführungen nach den Figuren 1 und 2, wobei sowohl die Kugel 3 als auch der Sitz 4 porös ausgebildet
25 sind.

In Figur 4 ist statt einer Kugel ein stabförmiges Ventilelement 31 vorgesehen, das als Filter ausgebildet ist und von einem Anschlag 32 erfaßt auf dem Sitz 4 ruht.

30

In den Figuren 4 bis 8 sind, ohne die Erfindung darauf zu beschränken, jeweils die Kugel 3 und der Sitz 4 nicht porös ausgebildet, wodurch sie die reine Ventilfunktion übernehmen. Im Gegensatz zu den Figuren 1 bis 4 wird in Figur 5 ein Teilbereich 5 der Pipettenwandung oberhalb des
35 Kugelventils mit einer Perforation in Form kleiner Bohrungen oder Schlitze 51 versehen. Dadurch wird die Flüssigkeit gezwungen bei

Druckbeaufschlagung der Dosierhilfe über die Perforationen 51 des Teilbereichs 5 auszutreten, so daß ausschließlich dieser Teilbereich als Filter für die Probenflüssigkeit wirkt.

5 Figur 6 entspricht im wesentlichen einer Ausführung nach Figur 5, wobei hier jedoch auch die Pipettenspitze 11 in einem Bereich 6 mit einer Perforation in Form kleiner Bohrungen oder Schlitzte versehen und das Pipettenende 12 verschlossen ist. Dadurch findet bereits bei der Aufnahme der Flüssigkeitsprobe eine Vorfiltration statt. Bevorzugt sind
10 die Perforationen im Bereich 6 grober ausgeführt als im Bereich 5.

Figur 7 entspricht einer Ausführung nach Fig. 5, wobei hier der untere Umfangsbereich 5 der Pipette 1 von außen mit einem weiteren Filterelement 71 versehen ist. Zugleich kann dieses Filterelement 71
15 Träger für Reaktionspartner der Probenflüssigkeit sein. Auf diese Weise kann durch mehrfaches Aufnehmen und Ausstoßen der Probenflüssigkeit sowohl die Effizienz der Reaktion als auch der Filtration erreicht werden.

Figur 8 entspricht einer Ausführung nach Fig. 7, wobei hier lediglich die
20 Anbringung weiterer Filterelemente 72 angedeutet ist. Durch eine Verringerung der Porosität der Filterelemente 5, 71, 72 in Richtung nach außen wird einem vorzeitigen Verstopfen der gesamten Filterstrecke entgegengewirkt.

25 In Figur 9 ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Pipette 1 als Reaktor dargestellt. In diesem Beispiel ist die Kugel 3 bevorzugt aus einem magnetisierbaren Material gefertigt, wodurch ein Anheben der Kugel von außen, und damit eine zeitweise Außerkraftsetzung der Ventilwirkung ermöglicht wird. Oberhalb der Kugel 3 ist ein reaktiver
30 Träger 8 in Perlenform eingebracht, wobei die Füllstandshöhe dieser Perlen bevorzugt so bemessen ist, daß alle Öffnungen 51 erfaßt werden. Die Öffnungen 51 dienen dem Austausch und der Filtration der Flüssigkeit. Zum Aufnehmen oder Entfernen der Perlen (Partikel) 8 aus der Spitze der Pipette kann das Kugelventil in der beschriebenen Weise
35 in eine geöffnete Stellung gebracht werden.

Figur 10 stellt eine weitere Ausführungsform der Pipette 1 dar, bei der aber der Pipettenaustritt, das untere, verengte Ende 13, verschlossen ausgeführt ist. Bei dieser Ausführungsform sind wieder loch- oder schlitzartige Öffnungen 51 und ein reaktiver Träger 8 in Perlenform, jedoch ist kein Kugelventil vorgesehen. Die Probenflüssigkeit wird hier
5 entweder über das offene Pipettenende eingefüllt oder durch die Öffnungen 51 der Perforationsfläche 5 langsam eingesaugt, wodurch diese bereits bei der Aufnahme filternd wirkt.

10 In Figur 11 ist eine Pipette 1 am ein- bzw. auslaßseitigen Ende mit einer Fritte oder einem Filter 73 versehen, der/dem eine entsprechend reaktive Oberfläche gegeben ist, so daß der gesonderte reaktive Träger in Perlenform entfallen kann. Die Fritte oder der Filter 73 enthält die
15 Öffnungen für den Flüssigkeitsaustausch.

Figur 12 stellt eine weitere Ausführungsform dar, bei der das ein- bzw. auslaßseitige Pipettenende zwar ebenfalls mit einer Fritte oder einem Filter 73 verschlossen, der reaktive Träger 8 jedoch wiederum in Perlenform in die Pipette 1 eingebracht ist. Das hat den Vorteil, das der
20 reaktive Träger 8 im Bedarfsfall leichter auswechselbar ist.

Unter den Rahmen der Erfindung fallen alle weiteren denkbaren Bauformen, bei denen der Filter Bestandteil der Pipettenwandung und/oder des Ventils sein kann. Es können mehrere Filter gleicher oder
25 unterschiedlicher Beschaffenheit in eine Pipette integriert sein. Im Inneren der Pipette zwischen Ventil und Filter können lösliche oder suspendierbare Bestandteile vorliegen. Die Ventilausführungen können vielfältig beschaffen sein unter der Bedingung, daß der Flüssigkeitsstrom von unten nach oben die Befüllung der Pipette ermöglicht und der
30 Austritt der Flüssigkeit auf dem gleichen Wege verhindert oder erschwert wird.

Patentansprüche

1. Pipette, die einen Dosieransatz (2) aufweist, dadurch gekennzeichnet,
daß die Pipette (1) im Pipettenspitzenbereich mit einem integrierten
Verschlußmittel (3, 4; 32; 13; 73) und mit wenigstens einem
Filterelement (3; 4; 31; 5; 6; 71; 72; 73) versehen ist.
2. Pipette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das
Verschlußmittel durch ein Ventil, insbesondere ein Kugelventil
bestehend aus einer Kugel (3) und einem Sitz (4) gebildet ist.
3. Pipette nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die
Kugel (3) und/oder der Sitz (4) porös ausgebildet sind und ihnen die
Funktion des Filterelements zugewiesen ist.
4. Pipette nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die
Pipette (1) in ihrem unteren Umfangsbereich (5) mit loch- bzw.
schlitzförmigen Öffnungen (51) versehen ist, denen die Funktion eines
Filterelements zugewiesen ist, wobei die Kugel (3) und der Sitz (4)
unporös ausgebildet sind.
5. Pipette nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipette (1)
in ihrem unteren, mit loch- bzw. schlitzförmigen Öffnungen (51)
versehenen Umfangsbereich (5) äußerlich von wenigstens einem
weiteren Filterelement (71, 72) umfaßt ist.
6. Pipette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipette (1)
an der Pipettenspitze (12) verschlossen ist.
7. Pipette nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die
Pipettenspitze in einem Bereich (6) zwischen dem Sitz (4) und dem
Verschluß (12) mit einer Perforation versehen ist.
8. Pipette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipette (1)
im verengten Spitzenbereich (13) verschlossen ist.

9. Pipette nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipette (1) im verengten Spitzenbereich mit einer Fritte oder einem Filter (73) versehen ist.
- 5 10. Pipette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verschlußmittel durch ein stabförmiges, poröses Ventilelement (31), welches von einem Anschlag (32) aufgenommen ist, gebildet ist, wobei dem Ventilelement (31) zugleich die Filterfunktion zugewiesen ist.
- 10 11. Pipette nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Pipette (1) in der Nähe ihres unteren, verengten Endes ein reaktiver Träger vorgesehen ist.
12. Pipette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der reaktive
15 Träger mit mindestens einem immobilisierten Reaktionspartner versehen ist.
13. Pipette nach Anspruch 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß der reaktive Träger in Form von Partikeln (8) ausgebildet ist.
- 20 14. Pipette nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel (8) den Bereich (5) mit den loch- oder schlitzförmigen Öffnungen (51) einnehmen.
- 25 15. Pipette nach Anspruch 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß der reaktive Träger in die Fritte oder einen Filter (73) oder in ein weiteres Filterelement (71, 72) eingebracht ist.
- 30 16. Pipette nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kugel (3) magnetisierbar ausgebildet ist.
17. Reaktor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipette (1) aus Polypropylen oder Polyethylen besteht.
- 35 18. Reaktor nach Anspruch 1 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumen der Pipette 0,001 bis 10 ml umfaßt.

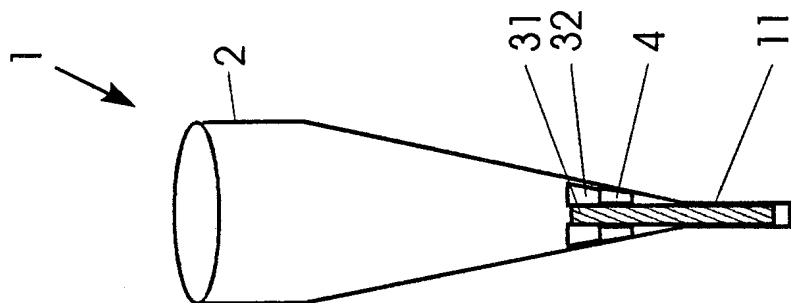


Fig. 1

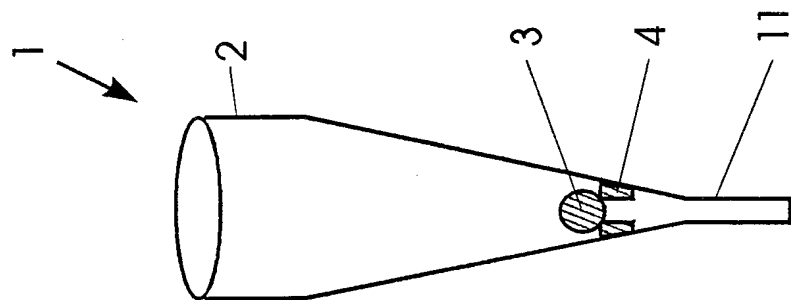


Fig. 2

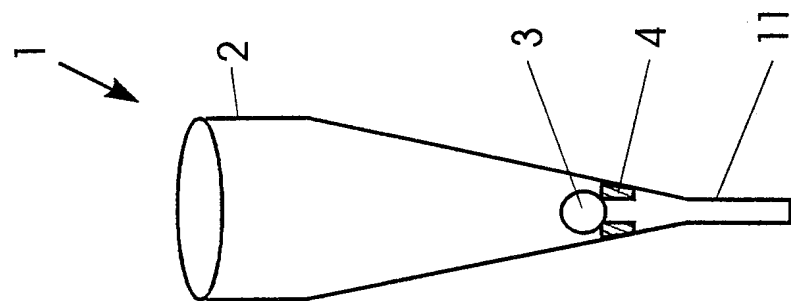


Fig. 3

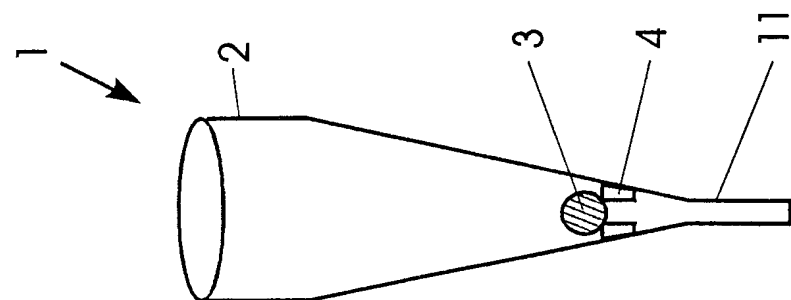


Fig. 4

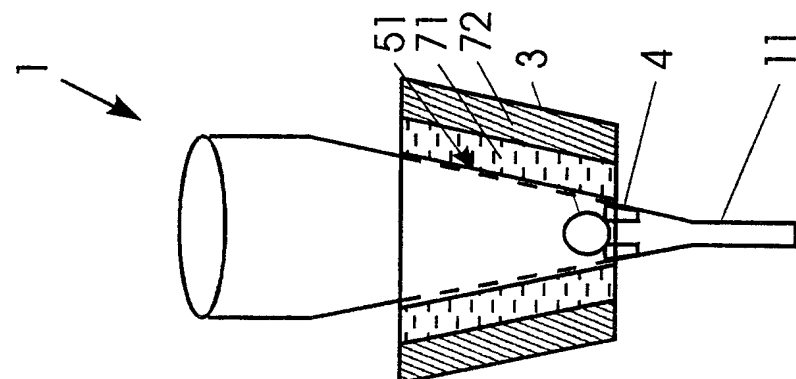


Fig. 8

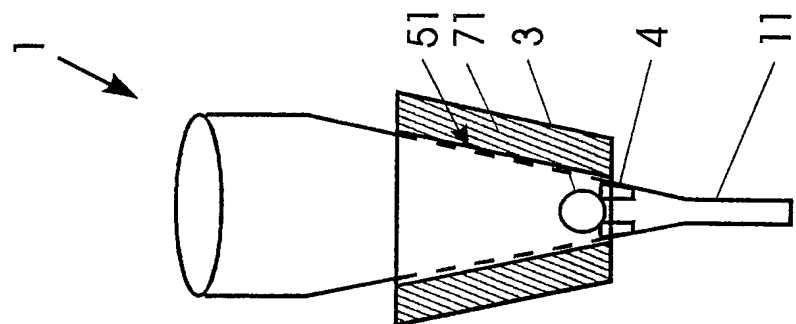


Fig. 7

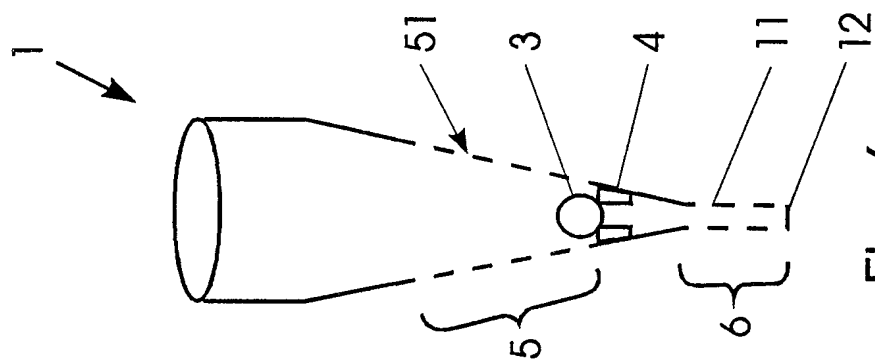


Fig. 6

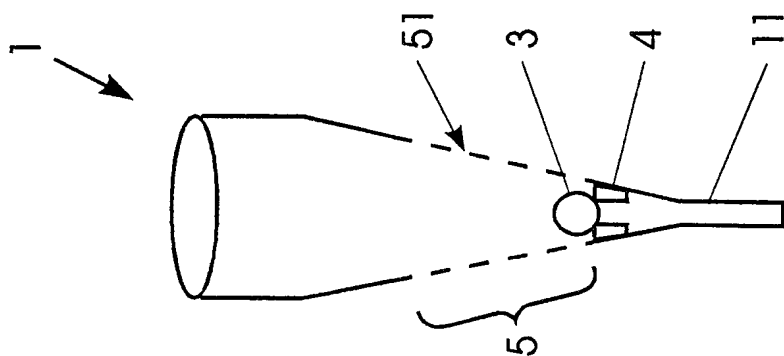


Fig. 5

3 / 3

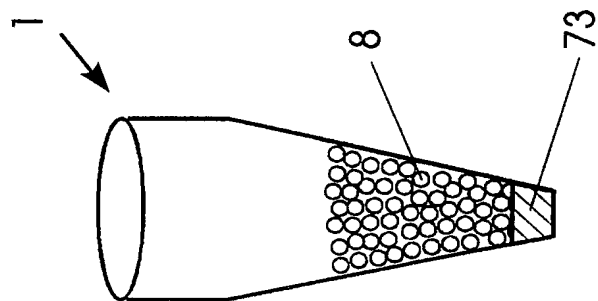


Fig. 9

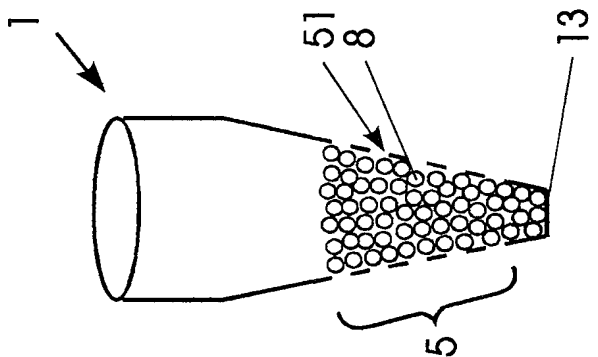


Fig. 10

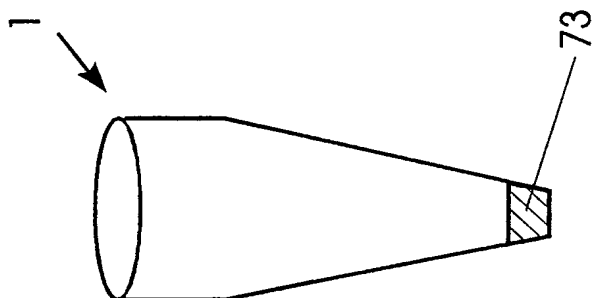


Fig. 11

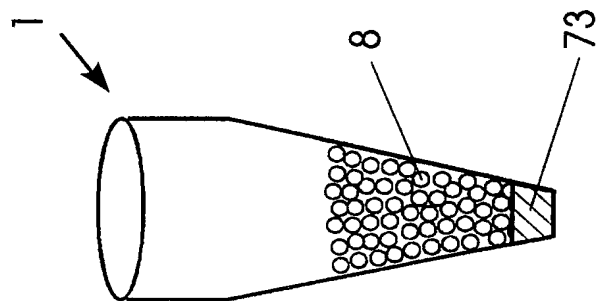


Fig. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05696

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01L3/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	FR 2 129 003 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 27 October 1972 see page 1, line 1 - line 33 see page 2, line 11 - page 3, line 12; figure 1	1, 11, 12, 15
---	--	---------------

X	US 3 985 032 A (AVAKIAN SOUREN) 12 October 1976 see column 2, line 15 - line 43; figures 1, 2, 5, 6	1-3, 10
---	--	---------

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 1998

Date of mailing of the international search report

17/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05696

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 175 326 A (ORION YHTYMAE OY) 26 March 1986 see page 4, line 13 - line 20 see page 4, line 27 - line 29 see page 5, line 1 - line 10 see page 6, line 24 - page 7, line 3 see page 7, line 15 - line 17 see page 9, line 6 - line 9; figures 1,2 -----	1,11
P,A	WO 97 29846 A (AALTO SCIENT LTD) 21 August 1997 see page 3, line 1 - page 4, line 26 see page 6, line 21 - page 8, line 1 see figures 1-5 -----	1-3, 11-13,15
A	US 5 364 595 A (SMITH MICHAEL W) 15 November 1994 see column 2, line 61 - column 3, line 31; figure 1 see column 5, line 1 - line 4 -----	1,10
A	US 5 058 441 A (WHELAN JAMES P) 22 October 1991 see column 2, line 44 - line 68 see column 8, line 17 - line 53; figures 1-5 -----	1,2
A	US 5 474 744 A (LERCH ERICH) 12 December 1995 see claims 1-4; figure 1 -----	1,17
A	WO 94 11108 A (LABSYSTEMS OY ;JAERVIMAEKI KARI (FI)) 26 May 1994 see page 2, line 31 - page 3, line 7; figure 6 -----	1,2,16, 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05696

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2129003 A	27-10-72	BE 780424 A	03-07-72
US 3985032 A	12-10-76	NONE	
EP 0175326 A	26-03-86	AU 571697 B	21-04-88
		AU 4280185 A	10-04-86
		BR 8502683 A	27-05-86
		CA 1251716 A	28-03-89
		DK 226385 A	18-03-86
		IN 165193 A	26-08-89
		JP 61073054 A	15-04-86
WO 9729846 A	21-08-97	AU 2255897 A	02-09-97
US 5364595 A	15-11-94	CA 2124639 A	03-01-95
		DE 69407492 D	05-02-98
		EP 0631817 A	04-01-95
		JP 7148441 A	13-06-95
US 5058441 A	22-10-91	AU 7163791 A	18-07-91
		WO 9109293 A	27-06-91
		US 5209128 A	11-05-93
US 5474744 A	12-12-95	CA 2132270 A	29-04-95
		EP 0651255 A	03-05-95
		JP 7185360 A	25-07-95
WO 9411108 A	26-05-94	AU 676233 B	06-03-97
		AU 5422994 A	08-06-94
		EP 0668795 A	30-08-95
		FI 952275 A	10-05-95
		JP 8505083 T	04-06-96
		US 5660797 A	26-08-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05696

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 B01L3/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 129 003 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 27. Oktober 1972 siehe Seite 1, Zeile 1 - Zeile 33 siehe Seite 2, Zeile 11 - Seite 3, Zeile 12; Abbildung 1 ----	1, 11, 12, 15
X	US 3 985 032 A (AVAKIAN SOUREN) 12. Oktober 1976 siehe Spalte 2, Zeile 15 - Zeile 43; Abbildungen 1, 2, 5, 6 ----- -/-	1-3, 10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/02/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05696

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 175 326 A (ORION YHTYMAE OY) 26.März 1986 siehe Seite 4, Zeile 13 - Zeile 20 siehe Seite 4, Zeile 27 - Zeile 29 siehe Seite 5, Zeile 1 - Zeile 10 siehe Seite 6, Zeile 24 - Seite 7, Zeile 3 siehe Seite 7, Zeile 15 - Zeile 17 siehe Seite 9, Zeile 6 - Zeile 9; Abbildungen 1,2 ----	1,11
P,A	WO 97 29846 A (AALTO SCIENT LTD) 21.August 1997 siehe Seite 3, Zeile 1 - Seite 4, Zeile 26 siehe Seite 6, Zeile 21 - Seite 8, Zeile 1 siehe Abbildungen 1-5 ----	1-3, 11-13,15
A	US 5 364 595 A (SMITH MICHAEL W) 15.November 1994 siehe Spalte 2, Zeile 61 - Spalte 3, Zeile 31; Abbildung 1 siehe Spalte 5, Zeile 1 - Zeile 4 ----	1,10
A	US 5 058 441 A (WHELAN JAMES P) 22.Oktober 1991 siehe Spalte 2, Zeile 44 - Zeile 68 siehe Spalte 8, Zeile 17 - Zeile 53; Abbildungen 1-5 ----	1,2
A	US 5 474 744 A (LERCH ERICH) 12.Dezember 1995 siehe Ansprüche 1-4; Abbildung 1 ----	1,17
A	WO 94 11108 A (LABSYSTEMS OY ;JAERVIMAEKI KARI (FI)) 26.Mai 1994 siehe Seite 2, Zeile 31 - Seite 3, Zeile 7; Abbildung 6 -----	1,2,16, 17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05696

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2129003 A	27-10-72	BE 780424 A	03-07-72
US 3985032 A	12-10-76	KEINE	
EP 0175326 A	26-03-86	AU 571697 B	21-04-88
		AU 4280185 A	10-04-86
		BR 8502683 A	27-05-86
		CA 1251716 A	28-03-89
		DK 226385 A	18-03-86
		IN 165193 A	26-08-89
		JP 61073054 A	15-04-86
WO 9729846 A	21-08-97	AU 2255897 A	02-09-97
US 5364595 A	15-11-94	CA 2124639 A	03-01-95
		DE 69407492 D	05-02-98
		EP 0631817 A	04-01-95
		JP 7148441 A	13-06-95
US 5058441 A	22-10-91	AU 7163791 A	18-07-91
		WO 9109293 A	27-06-91
		US 5209128 A	11-05-93
US 5474744 A	12-12-95	CA 2132270 A	29-04-95
		EP 0651255 A	03-05-95
		JP 7185360 A	25-07-95
WO 9411108 A	26-05-94	AU 676233 B	06-03-97
		AU 5422994 A	08-06-94
		EP 0668795 A	30-08-95
		FI 952275 A	10-05-95
		JP 8505083 T	04-06-96
		US 5660797 A	26-08-97